

| | |
|---------|---|
| 氏 | 辻本 紗代子 |
| 授与した学位 | 博士 |
| 専攻分野の名称 | 歯学 |
| 学位授与の番号 | 博 甲 第 3103 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 18 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当) |
| 学位論文題名 | 浸潤・転移能の異なる口腔扁平上皮癌細胞株の低酸素環境の影響による浸潤形質の変化に関する研究 |
| 論文審査委員 | 教授 山本 敏男 教授 永井 教之 教授 佐々木 朗 |

学位論文内容の要旨

【緒言】

腫瘍内低酸素は固形癌に特徴的な微小環境のひとつであり、腫瘍細胞が低酸素を感知すると低酸素誘導性因子（以下HIF-1 α ）が活性化し、腫瘍の悪性形質の転換や進展に関わるといわれている。近年、卵巣癌などでは低酸素環境におけるc-Met(肝細胞増殖因子HGFレセプター)の活性化による腫瘍細胞の運動能および浸潤・転移能の亢進や、E-カドヘリン（以下E-CD）の発現低下の誘発などが報告されているが、口腔癌においてこれらの検出は少ない。また、癌細胞の離脱に続いて引き起こる癌細胞の浸潤には、細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMP）-2およびMMP-9の関与が重要であり、低酸素環境下ではMMPsの発現が亢進し、それにより浸潤が促進されると報告されている。

このように様々な癌において、腫瘍内の低酸素状態が強いほど、浸潤・転移を起こしやすいとされている。しかし、腫瘍組織は異なった形質を持つ細胞の集合体であるため、不明な点が多い。そこで本研究では、固形癌の内部環境のひとつである低酸素状態が、同一原発巣より樹立した浸潤・転移能の異なる口腔扁平上皮癌に対してどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的に、低酸素環境における運動能・浸潤能の変化、およびこれに関わる因子を検討した。

【材料および方法】

1. 培養細胞株および培養法

舌癌患者の同一原発巣より樹立した、高浸潤・転移細胞株 UM1 と、低浸潤・転移細胞株 UM2 を使用した。両細胞の培養は、10%FBS を含む D-MEM/ハム F12 培地を用い、通常培養を 20%O₂、低酸素環境を 1%O₂ とした。まず、低酸素環境が増殖能に影響を及ぼしていないことと、HIF1- α の発現をウエスタンブロット法（以下 WB 法）にて確認し、以下の実験を行った。

2. UM1, UM2 の低酸素環境下における運動能・浸潤能の検討

引っ掻き試験および、セルカルチャーインサートを用いた migration assay にて運動能を検討した。また、浸潤能の検討にはラフトカルチャー法を用いた。

3. UM1, UM2 の低酸素環境下における運動能・浸潤能に変化を及ぼす因子の検討

癌細胞の運動能・増殖能に変化を及ぼす HGF のレセプターである c-Met の発現を WB 法にて検討した。また、浸潤能に変化を及ぼす因子として、MMP-2, MMP-9, および MMP-2 の活性化に関与する MT1-MMP の発現を RT-PCR 法にて検討した。

4. UM1, UM2 の低酸素環境下における E-CD および Snail の発現の検討

細胞接着因子 E-CD の発現を WB 法および RT-PCR 法にて検討し、E-CD の発現の制御について E-CD の転写因子 Snail を RT-PCR 法にて検討した。

【結果および考察】

通常培養下では運動能の高いUM1が低酸素培養下では運動能が低下し、それに伴いc-Metの発現も低下した。一方通常培養下において運動能の低かったUM2は、低酸素培養下において運動能が亢進し、c-Metの発現も亢進した。低酸素培養下でのHGFを添加による、運動能の変化を検討したところ、低酸素培養下においてc-Metの発現が低下するUM1では、HGFを添加しても運動能に差はみられなかった。しかし、低酸素培養下においてc-Metの発現が亢進したUM2では、HGFの添加により運動能が亢進した。これには、HGFの感受性とc-Metの発現の相関関係や、低酸素環境がHGF感受性の高い細胞株の浸潤能を促進するとの報告があることから、UM1,UM2のc-Metの発現と運動能の変化に、HGFの感受性の違いが関与していると推察された。

次に、ラフトカルチャー法にて浸潤能を検討したところ、UM1は通常培養下で細胞の浸潤がみられたが、低酸素培養下では抑制され、UM2は通常培養下、低酸素培養下ともに細胞は浸潤しなかった。通常培養下におけるUM1の浸潤能にはMMP-2,MMP-9の発現の高さが、関与していると考えられた。UM1が低酸素培養下において浸潤能が低下する原因には、運動能の低下に加え、MT1-MMPの低下によるMMP-2の不活性化と、MMP-9の発現の低下が関係していると考えられた。一方、UM2はMT1-MMPに変化はなく、MMP-2の発現が亢進するもののMMP-9の発現がみられなかった上、元来の発現がUM1に比べて著しく低いことが、UM2が低酸素環境下において運動能が亢進したにも関わらず、浸潤能が抑制されていたことのひとつとして考えられる。

ところで近年、口腔癌におけるc-Metの過剰発現による運動能や浸潤能の促進に、HGF/c-MetとE-CDの細胞接着システムとの相互作用がかかわっていると報告されている。UM1とUM2の大きな相違点のひとつは、E-CD蛋白の発現が異なる点であり、UM1はUM2に比べてE-CDの発現が弱いという性質を有することから続いて低酸素環境とE-CDの発現を検討した。その結果、低酸素培養下においてc-Metの発現が低下していたUM1では、E-CDは亢進し、c-Metの発現が亢進していたUM2では、E-CDが抑制された。E-CDの発現の制御には、様々な癌において、E-CD遺伝子の転写抑制因子であるSnailの発現などが報告されていることから、次に低酸素環境下におけるE-CDと、Snailの発現について検討した。通常培養下では、UM1のE-CDの発現は低く、Snailの発現は高かったが、低酸素培養下では逆にE-CDの発現が高くなり、Snailは抑制された。反対に、UM2においては通常培養下でE-CDの発現が高くSnailの発現は低かったが、低酸素培養下ではE-CDの発現が低下し、Snailの発現は亢進した。以上のようにUM1,UM2のE-CDとSnailの発現が逆相関していることから、低酸素環境におけるE-CDの発現の調節にはSnailが関与していることが示唆された。

頭頸部癌をはじめとする多くの腫瘍では、低酸素環境によって浸潤・転移が進行すると報告されている。本研究ではUM1が、低酸素培養下で細胞間接着の促進や運動能の抑制が起こり、逆にUM2が、細胞間接着の低下、運動能の促進など浸潤・転移能を獲得する傾向にあった。このように腫瘍組織において、たとえ浸潤・転移能が低いと診断されても、低酸素環境により、浸潤・転移能を獲得する可能性があることから、臨床的に重要な問題点であると示唆された。腫瘍は、栄養血管からの酸素や栄養による供給が必要であり、そのために腫瘍は自ら血管新生因子を産生し、周囲から血管を誘導しつつ増殖していく。近年、癌の増殖に必要な血管新生を標的とした血管新生阻害剤や、強力な血管新生因子を誘導するHIF-1 α を分子標的とした治療法などが開発されつつある。しかし、本研究において示したようにUM2のような本来浸潤・転移能が低い癌細胞が血管新生阻害により起こる低酸素環境により浸潤・転移能を獲得しうる可能性が考えられる。このことから、血管新生阻害剤などの治療の際には癌の局所環境に対する癌細胞の応答性についても考慮すべきだと考えられた。

【結 論】

形質の異なる細胞の集合体である口腔扁平上皮癌の中で、低浸潤・低転移能を有する癌細胞においても、低酸素環境により浸潤・転移能を獲得する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

固形癌の増大に伴い腫瘍の内部環境は低酸素状態に陥り、癌細胞が腫瘍内低酸素を感知することにより低酸素反応性因子HIF-1 α の発現を亢進させる。それにより、細胞接着因子E-カドヘリン (E-CD) の発現の低下や、血管新生促進因子VEGF, 細胞外マトリックス分解酵素MMPの発現の亢進など、様々な因子を誘導し、多くの癌において浸潤・転移などの悪性形質の転換と進展に影響を与えているといわれている。また近年、卵巣癌などではHIF-1 α の活性化が、肝細胞増殖性因子 (HGF) のレセプターであるc-Metの発現を誘導することが報告されている。この、HGFとは、細胞の増殖や運動能の亢進などに関与している増殖因子として知られている。しかし、腫瘍組織は異なった形質を持つ癌細胞の集合体であるため、全ての癌細胞が低酸素環境において同じ動態を示すわけではないと考えられる。

本研究は、低酸素環境が、異なる浸潤・転移能を有する口腔扁平上皮癌にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。そのために同一原発巣から樹立した細胞株を用いることが、異なった患者から樹立した細胞株を比較するよりも有用である。本研究では、舌癌患者の同一原発巣より樹立した散在性増殖を示す高浸潤・転移細胞株UM1と、島状増殖を示す低浸潤・転移細胞株UM2を用いた。研究項目として、低酸素環境下におけるUM1, UM2の運動能, 浸潤能および、それに関わる因子として、E-CD, MMP, c-Metの発現の変化を検討し、以下の結論を得ている。

1. 低酸素環境下においてUM1の運動能・浸潤能は低下し、UM2の運動能は亢進した。
2. 低酸素環境下において運動能・浸潤能が低下していたUM1はE-CDの発現が亢進し、c-Met, MMPの発現は低下していた。逆に運動能が亢進していたUM2ではE-CDの発現が低下し、c-Met, MMPの発現が亢進していた。
3. 血流のある酸素濃度の高い部位ではUM1が腫瘍増大に働き、低酸素環境部位ではUM2の細胞間接着が低下し、運動能が亢進するなど、転移能を獲得する可能性が示唆された。

これらの結果は形質の異なる細胞の集合体である口腔扁平上皮癌において、低浸潤・低転移能を有する癌細胞であっても低酸素環境により癌の浸潤・転移が誘発される可能性が示唆された。

これらの知見は口腔扁平上皮癌の浸潤・転移の解明のための基礎的研究として臨床的にも価値のある研究業績である。従って、本申請論文は博士 (歯学) の学位授与に値するものであると判定した。